

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-328114

(P2002-328114A)

(43)公開日 平成14年11月15日(2002. 11. 15)

(51)IntCl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターミナル*(参考)
G 0 1 N 27/64		G 0 1 N 27/64	B 2 G 0 4 5
27/62		27/62	K 5 C 0 3 8
			L
33/483		33/483	C
33/68		33/68	
審査請求 有 請求項の数28 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002-44340(P2002-44340)  
 (22)出願日 平成14年2月21日(2002. 2. 21)  
 (31)優先権主張番号 特願2001-51919(P2001-51919)  
 (32)優先日 平成13年2月27日(2001. 2. 27)  
 (33)優先権主張国 日本(J P)

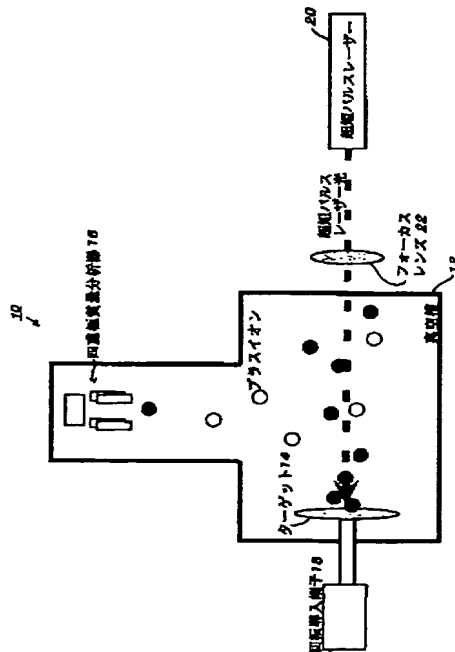
(71)出願人 000006792  
 理化学研究所  
 埼玉県和光市広沢2番1号  
 (72)発明者 林崎 良英  
 茨城県つくば市稲荷前22-1-201  
 (72)発明者 谷畑 勇夫  
 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
 内  
 (74)代理人 100087000  
 弁理士 上島 淳一  
 Fターム(参考) 2G045 CA25 DA13 DA14 DA30 DA60  
 FA11 FA12  
 5C038 JJ06

(54)【発明の名称】 レーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステム

## (57)【要約】

【課題】高分子を構成する構成原子の原子化とイオン化とを1台のレーザーで同時に実現することを可能にして、システム構成を大幅に簡潔化する。

【解決手段】分析の対象である高分子にレーザー光を照射して該高分子をアブレーションすることにより、高分子を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法であって、分析の対象である高分子に照射して、該高分子をアブレーションするレーザー光は超短パルスレーザー光であり、該超短パルスレーザー光を分析の対象である高分子に照射して、該高分子をアブレーションすることによって、該高分子を構成元素に原子化すると同時にイオン化し、イオン化した構成元素を分析する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析の対象である高分子にレーザー光を照射して該高分子をアブレーションすることにより、高分子を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法であって、

分析の対象である高分子に照射して、該高分子をアブレーションするレーザー光は超短パルスレーザー光であり、  
該超短パルスレーザー光を分析の対象である高分子に照射して、該高分子をアブレーションすることによって、該高分子を構成元素に原子化すると同時にイオン化し、イオン化した構成元素を分析するものであるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項2】 請求項1に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、  
分析の対象である高分子は、固相化されたものであるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項3】 請求項2に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、  
高分子の固相化の方法は、基板上に分析の対象である高分子の溶液を滴下して乾燥することにより固相化する過程を含む方法であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項4】 請求項3に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、  
前記基板は固体であり、該固体の熱伝導率は $0.1 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$  以上であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項5】 請求項1に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、  
分析の対象である高分子は、元素標識を付けたものであるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項6】 請求項5に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、  
前記元素標識は、周期律表において1族元素であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項7】 請求項5に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、  
前記元素標識は、周期律表において16族元素であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項8】 請求項5に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、  
前記元素標識は、周期律表において17族元素であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項9】 請求項5に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、  
前記元素標識は、周期律表において遷移金属元素であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項10】 請求項5に記載のレーザーアブレーション

ーションを用いた高分子の分析方法において、  
前記元素標識は、安定同位元素標識であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項11】 請求項1～10のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、

分析の対象である高分子に照射して、該高分子をアブレーションする超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が10ピコ秒以下であり、尖頭値出力が10メガワット以上であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項12】 請求項11に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、  
分析の対象である高分子に照射して、該高分子をアブレーションする超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1ギガワット以上10ギガワット以下であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項13】 請求項1～12のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、

前記イオン化した構成元素の分析は、質量分析であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項14】 請求項13に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、  
質量分析は、飛行時間法による質量分析であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項15】 請求項1～14のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、

イオン化した複数の構成元素を同時に分析するものであるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項16】 請求項1～15のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、

分析の対象である高分子は、DNAマイクロアレイに定着された核酸または核酸の類似体であるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項17】 請求項16に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、

前記DNAマイクロアレイは、多チャンネル化したDNAマイクロアレイであるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項18】 請求項1～17のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法において、

高分子をアブレーションする短パルスレーザー光と分析の対象である高分子とは、少なくともいずれか一方を移動させることにより、該高分子をアブレーションする短パルスレーザー光により該分析の対象である高分子を遺

漏、重複なくアブレーションして分析を行うレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法。

【請求項 19】 分析の対象である高分子にレーザー光を照射して該高分子をアブレーションすることにより、高分子を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いた高分子の分析システムであって、内部にターゲットを配置可能な真空槽と、前記真空槽内に配置された分析器と、超短パルスレーザー光を出射して前記真空槽内に配置されたターゲットへ照射する超短パルスレーザーとを有する高分子の分析システム。

【請求項 20】 請求項 19 に記載の高分子の分析システムにおいて、さらに、前記真空槽内においてターゲットを移動する移動手段とを有する高分子の分析システム。

【請求項 21】 請求項 20 に記載の高分子の分析システムにおいて、前記ターゲットを移動する移動手段は、ターゲットを回転する回転手段である高分子の分析システム。

【請求項 22】 請求項 19 に記載の高分子の分析システムにおいて、さらに、超短パルスレーザー光のターゲットへの照射位置を移動する移動手段とを有する高分子の分析システム。

【請求項 23】 請求項 19～22 のいずれか 1 項に記載の高分子の分析システムにおいて、前記分析器は、質量分析器である高分子の分析システム。

【請求項 24】 請求項 23 に記載の高分子の分析システムにおいて、前記質量分析器は、四重極質量分析器である高分子の分析システム。

【請求項 25】 請求項 23 に記載の高分子の分析システムにおいて、前記質量分析器は、飛行時間質量分析器である高分子の分析システム。

【請求項 26】 請求項 23 に記載の高分子の分析システムにおいて、前記質量分析器は、イオンサイクロトロン型フーリエ変換質量分析器である高分子の分析システム。

【請求項 27】 請求項 19～26 のいずれか 1 項に記載の高分子の分析システムにおいて、前記超短パルスレーザーは、パルス時間幅が 10 ピコ秒以下であり、尖頭値出力が 10 メガワット以上である短パルスレーザー光を照射する高分子の分析システム。

【請求項 28】 請求項 27 に記載の高分子の分析システムにおいて、前記超短パルスレーザーは、パルス時間幅が 1 フェムト秒以上 1 ピコ秒以下であり、尖頭値出力が 1 ギガワット以上 10 ギガワット以下である短パルスレーザー光を照

射する高分子の分析システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、レーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムに関し、さらに詳細には、従来と比較すると分析の効率を著しく向上することを可能にしたレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムに関し、例えば、DNA、蛋白質、RNA、PNA、脂質、糖などの各種の高分子の質量分析に用いて好適なレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムに関する。

【0002】

【従来の技術】近年、質量分析法の応用範囲は、物理や化学の分野から医学や生化学などのライフサイエンスの分野へと急速に広がってきている。特に、蛋白質の分子量の決定解析やアミノ酸配列の決定解析などへの発展には、目を見張るものがある。

【0003】こうした質量分析法の原理は、試料を様々な方法でイオン化して、イオン化により得られたイオンを質量/電荷に従って分離し、分離した各イオンの強度を測定するというものである。

【0004】ところで、従来の高分子の質量分析は、高分子そのものに電子を付加してイオン化し、その質量を解析したり、高分子量の分子を低分子量の分子イオンに細分化して質量分析を行い、構成分子を比較するというものであった。

【0005】ここで、従来の高分子の質量分析におけるイオン生成方法としては、例えば、高分子に高エネルギー原子イオンを衝突させてイオン化する 2 次イオン質量分析 (SIMS) 法や、電子衝撃によって低分子量の分子イオンに細分化して質量分析を行う電子イオン化 (ED) 法、マトリックス支援レーザーイオン化 (MALDI) 法などが知られている。

【0006】しかしながら、上記したいずれの方法においても、高分子イオンを質量分析するため高分解能の質量分析装置が必要であるという問題点や、中途半端に分解生成したフラグメントイオンの存在が質量スペクトルの解析を困難にするという問題点などがあった。

【0007】一方、従来より、化学分析に際して同位元素で標識した高分子試料の質量分析方法としては、例えば、ナノ秒レーザーにより原子化およびイオン化を行うレーザー原子化共鳴イオン化 (LARIMP) 法が知られている。

【0008】しかしながら、この LARIMP 法によれば、レーザーとして、標識元素を原子化するための原子化レーザーと原子化された標識元素の原子をイオン化するための共鳴イオン化レーザーとの 2 台のレーザーが必要となるため、システム構成が複雑になるという問題点があった。

【0009】さらに、LARIMP法においては、上記したように標識原子を共鳴イオン化する必要がある。このため、各標識原子に対して固有の波長のレーザー光を照射する必要がある、多種類の標識同位体が混入した状況では効率の良い分析を行うことが極めて困難であるという問題点があった。

#### 【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記したような従来の技術の有する種々の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、高分子を構成する構成原子の原子イオンを生成し、生成した原子イオンを分析するようにしたレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムであって、高分解能の分析装置を要しないようにしたレーザーアブレーションを用いた高分子の質量分析方法およびそのシステムを提供しようとするものである。より詳細には、例えば、質量分析を行う場合には、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除するとともに、質量分析装置に高分解能を要しないようにしたレーザーアブレーションを用いた高分子の質量分析方法およびそのシステムを提供しようとするものである。

【0011】また、本発明の目的とするところは、高分子を構成する構成原子の原子化とイオン化とを1台のレーザーで同時に実現することを可能にして、システム構成を大幅に簡潔化することを可能にしたレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムを提供しようとするものである。

【0012】さらに、本発明の目的とするところは、多種類の標識同位体が混入した状況においても、効率の良い分析を行うことを可能にしたレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムを提供しようとするものである。

#### 【0013】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明によるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムは、例えば、DNA、蛋白質、RNA、PNA、脂質、糖などの各種の高分子を超短パルスレーザー光でアブレーションすることにより、それら高分子を原子イオン化して原子イオンを生成し、生成した原子イオンを分析するようにしたものである。これにより、各種の高分子の化学分析を行うことができるものである。

【0014】即ち、本発明のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムによれば、高分子を超短パルスレーザー光でアブレーションすることにより、高分子をバラバラに分解して当該高分子を構成する各原子毎に原子化すると同時に、原子化した原子を1個のイオンにイオン化するものであり、このイオン化により生成された原子イオンを分析することにより、定量分析が可能となるものである。

【0015】従って、本発明のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムにおいて質量分析を行う場合には、低質量の原子イオンを質量分析することになり、質量スペクトルの解析が困難になる恐れがなくなるのみならず、質量分析装置が高分解能を備える必要がなくなる。

【0016】また、上記したように、本発明のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムによれば、超短パルスレーザー光で高分子をアブレーションすることにより、高分子の原子化と同時に、原子化された原子の1個のイオンへのイオン化を効率良く行うことが可能となる。従って、システム構成を簡潔化することができるようになるとともに、例えば、化学分析に際して多種類の標識元素を同時に使用することが可能となるため、解析効率を著しく向上させることができる。

【0017】つまり、本発明のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムにおいては、標識元素の原子化とイオン化とを1台の超短パルスレーザーで同時に行うことができるため、システム構成を大幅に簡略化することが可能となる。

【0018】さらに、上記したイオン化は、超短パルスレーザー光の高い尖頭値強度によって非共鳴過程によって行われるイオン化（非共鳴イオン化）であるので、多種類の標識同位体が混入した状況においても各標識原子をそれぞれイオン化することができ、多標識系への応用が容易であり、高精度かつ高効率な高分子の分析を行うことができるようになる。

【0019】このため、本発明のレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムは、今後ますます重要性を増す遺伝子発現量の定量解析などに用いて極めて好適である。

【0020】即ち、本発明のうち請求項1に記載の発明は、分析の対象である高分子にレーザー光を照射して該高分子をアブレーションすることにより、高分子を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法であって、分析の対象である高分子に照射して、該高分子をアブレーションするレーザー光は超短パルスレーザー光であり、該超短パルスレーザー光を分析の対象である高分子に照射して、該高分子をアブレーションすることによって、該高分子を構成元素に原子化すると同時にイオン化し、イオン化した構成元素を分析するようにしたものである。

【0021】ここで、上記分析としては、例えば、質量分析を挙げることができるが、質量分析以外の分析としては、具体的には、例えば、化学的分析（通常のいわゆる化学分析）や光学的分析（蛍光法など）が挙げられる。

【0022】また、本発明のうち請求項2に記載の発明

は、本発明のうち請求項 1 に記載の発明において、分析の対象である高分子は、固相化されたものであるようにしたものである。

【0023】また、本発明のうち請求項 3 に記載の発明は、本発明のうち請求項 2 に記載の発明において、高分子の固相化の方法は、基板上に分析の対象である高分子の溶液を滴下して乾燥することにより固相化する過程を含む方法であるようにしたものである。

【0024】また、本発明のうち請求項 4 に記載の発明は、本発明のうち請求項 3 に記載の発明において、上記基板は固体であり、該固体の熱伝導率は  $0.1 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$  以上であるようにしたものである。

【0025】また、本発明のうち請求項 5 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1 に記載の発明において、分析の対象である高分子は、元素標識を付けたものとしたものである。

【0026】また、本発明のうち請求項 6 に記載の発明は、本発明のうち請求項 5 に記載の発明において、上記元素標識は、周期律表において 1 族元素としたものである。

【0027】また、本発明のうち請求項 7 に記載の発明は、本発明のうち請求項 5 に記載の発明において、上記元素標識は、周期律表において 16 族元素としたものである。

【0028】また、本発明のうち請求項 8 に記載の発明は、本発明のうち請求項 5 に記載の発明において、上記元素標識は、周期律表において 17 族元素としたものである。

【0029】また、本発明のうち請求項 9 に記載の発明は、本発明のうち請求項 5 に記載の発明において、上記元素標識は、周期律表において遷移金属元素としたものである。

【0030】また、本発明のうち請求項 10 に記載の発明は、本発明のうち請求項 5 に記載の発明において、上記元素標識は、安定同位元素標識であるようにしたものである。

【0031】また、本発明のうち請求項 11 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の発明において、分析の対象である高分子に照射して、該高分子をアブレーションする超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が 10 ピコ秒以下であり、尖頭値出力が 10 メガワット以上であるようにしたものである。

【0032】また、本発明のうち請求項 12 に記載の発明は、本発明のうち請求項 11 に記載の発明において、分析の対象である高分子に照射して、該高分子をアブレーションする超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が 1 フェムト秒以上 1 ピコ秒以下であり、尖頭値出力が 1 ギガワット以上 10 ギガワット以下であるようにしたものである。

【0033】また、本発明のうち請求項 13 に記載の発

明は、本発明のうち請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の発明において、上記イオン化した構成元素の分析は、質量分析であるようにしたものである。

【0034】また、本発明のうち請求項 14 に記載の発明は、本発明のうち請求項 13 に記載の発明において、質量分析は、飛行時間法による質量分析であるようにしたものである。

【0035】また、本発明のうち請求項 15 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の発明において、イオン化した複数の構成元素を同時に分析するようにしたものである。

【0036】また、本発明のうち請求項 16 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の発明において、分析の対象である高分子は、DNA マイクロアレイに定着された核酸または核酸の類似体であるようにしたものである。

【0037】なお、核酸または核酸の類似体としては、具体的には、例えば、DNA、RNA、PNA が挙げられる。

【0038】また、本発明のうち請求項 17 に記載の発明は、本発明のうち請求項 16 に記載の発明において、上記 DNA マイクロアレイは、多チャンネル化した DNA マイクロアレイであるようにしたものである。

【0039】また、本発明のうち請求項 18 に記載の発明は、本発明のうち請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の発明において、高分子をアブレーションする短パルスレーザー光と分析の対象である高分子とは、少なくともいずれか一方を移動させることにより、該高分子をアブレーションする短パルスレーザー光により該分析の対象である高分子を遺漏、重複なくアブレーションして分析を行うようにしたものである。

【0040】また、本発明のうち請求項 19 に記載の発明は、分析の対象である高分子にレーザー光を照射して該高分子をアブレーションすることにより、高分子を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いた高分子の分析システムであって、内部にターゲットを配置可能な真空槽と、上記真空槽内に配置された分析器と、超短パルスレーザー光を出射して上記真空槽内に配置されたターゲットへ照射する超短パルスレーザーとを有するようにしたものである。

【0041】また、本発明のうち請求項 20 に記載の発明は、本発明のうち請求項 19 に記載の発明において、さらに、上記真空槽内においてターゲットを移動する移動手段とを有するようにしたものである。

【0042】また、本発明のうち請求項 21 に記載の発明は、本発明のうち請求項 20 に記載の発明において、上記ターゲットを移動する移動手段は、ターゲットを回転する回転手段であるようにしたものである。

【0043】また、本発明のうち請求項 22 に記載の発

明は、本発明のうち請求項19に記載の発明において、さらに、超短パルスレーザー光のターゲットへの照射位置を移動する移動手段とを有するようにしたものである。

【0044】また、本発明のうち請求項23に記載の発明は、本発明のうち請求項19～22のいずれか1項に記載の発明において、上記分析器は、質量分析器であるようにしたものである。

【0045】また、本発明のうち請求項24に記載の発明は、本発明のうち請求項23に記載の発明において、上記質量分析器は、四重極質量分析器であるようにしたものである。

【0046】また、本発明のうち請求項25に記載の発明は、本発明のうち請求項23に記載の発明において、上記質量分析器は、飛行時間質量分析器であるようにしたものである。

【0047】また、本発明のうち請求項26に記載の発明は、本発明のうち請求項23に記載の発明において、上記質量分析器は、イオンサイクロトロン型フーリエ変換質量分析器であるようにしたものである。

【0048】また、本発明のうち請求項27に記載の発明は、本発明のうち請求項19～26のいずれか1項に記載の発明において、上記超短パルスレーザーは、パルス時間幅が10ピコ秒以下であり、尖頭値出力が10メガワット以上である短パルスレーザー光を照射するようにしたものである。

【0049】また、本発明のうち請求項28に記載の発明は、本発明のうち請求項26に記載の発明において、上記超短パルスレーザーは、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1ギガワット以上10ギガワット以下である短パルスレーザー光を照射するようにしたものである。

【0050】ここで、本発明において超短パルスレーザー光により高分子をアブレーションする際には、高分子に超短パルスレーザー光を1ショット（1パルス）照射すれば十分である。しかしながら、高分子に超短パルスレーザー光を複数ショット（複数パルス）照射してもよく、高分子への照射する超短パルスレーザー光のショット数（パルス数）は適宜に選択すればよい。

【0051】また、超短パルスレーザーとは、パルス時間幅が10ピコ秒以下であることが好ましく、特に、1フェムト秒以上1ピコ秒以下の通常はフェムト秒レーザーと称されるレーザーを用いるのが適当である。その尖頭値出力としては、10メガワット以上が好ましく、特に、1ギガワット以上10ギガワット以下が好ましい。

【0052】この範囲以上に大きいと多価イオンが生成されて、質量スペクトルの解析が困難となり、これ以下だと原子化・イオン化の効率が低下して、原子イオン信号を観測することができないからである。

【0053】なお、後述する発明者による実験によれ

ば、例えば、パルス時間幅が110フェムト秒、尖頭値出力2ギガワットの場合には、極めて良好な結果を得ることができた。

【0054】また、本発明によれば、原子化と同時にイオン化を効率良く行うことのできるフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を、同位元素で標識した高分子試料に照射するようにしている。このため、標識元素を選択的にイオン化する必要がなくなり、種々様々な標識元素を使用することが可能となる。その上、レーザー照射の繰り返しレートを数kHzまで上げることが可能であるため、高速解析に適している。

【0055】また、本発明では、高分子をアブレーションする短パルスレーザー光と分析の対象である高分子とは、少なくともいずれか一方を移動させることにより、該高分子をアブレーションする短パルスレーザー光により該分析の対象である高分子を遺漏、重複なくアブレーションして分析を行うようにしている。即ち、本発明においては、例えば、短パルスレーザー光のスポットと試料として分析の対象である高分子を塗布した基板との移動により、広い面積にわたって塗布された多数の試料を遺漏・重複することなくアブレーションすることを可能にしている。これは、DNAマイクロアレイへの応用において、特に有効である。

【0056】本発明は、これらの特徴から、解析速度が従来と比較して格段に早くなるばかりか、発現量の極めて少ない遺伝子の発現の同時解析を行うことを可能にするものである。

【0057】そして、本発明の具体的な応用例としては、例えば、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析があり、その解析を高速化することが可能となる。即ち、本発明によれば標識として多種類の同位元素を用いることが可能となり、標識として、例えば、安定同位元素を用いれば、標識の種類は多種類の安定同位体の数（270種類）にも増やすことができる。これは、従来の標識法である蛍光法（2～6種類）や放射性同位元素（約10種類）と比較して、飛躍的に情報量を増やすことができる。

【0058】より詳細には、DNAマイクロアレイ実験で用いる標識として、例えば、周期律表において1族の安定同位体である<sup>39</sup>K、<sup>41</sup>Kなど、周期律表において16族の安定同位体である<sup>32</sup>S、<sup>35</sup>Sなど、周期律表において17族の安定同位体である<sup>35</sup>Cl、<sup>37</sup>Clなど、周期律表において遷移金属の安定同位体である<sup>118</sup>Sn、<sup>120</sup>Snなどの安定同位元素を含むヌクレオチドでプローブを標識して使う。

【0059】プローブをDNAマイクロアレイ上のターゲット核酸とハイブリダイゼーションさせたのち、超短パルスレーザーでアブレーションし、分子の原子イオン化を行い、その後、例えば、質量分析器で検出すれば、ハイブリダイゼーションしたプローブ内に含まれて

いた同位元素の量を定量できる。従って、プローブの量比を計算して求めることができる。

【0060】ここで、従来のDNAマイクロアレイ技術においては、蛍光色素でプローブを標識していた。こうした従来の方法では、ハイブリダイゼーション後の検出に、専用検出装置を用いて10分間程度の時間を要していた。しかしながら、本発明を用いれば、高速化を図ることができる。

【0061】また、現在利用されている蛍光色素はわずか2種（Cy-3、Cy-5）だけであり、急速な増加は見込めないのが現状である。それに対して、例えば、安定同位元素を使えば、標識の種類を270種にも増やすことができる。

【0062】また、DNAマイクロアレイの遺伝子の発現データは、参照用サンプルに対する相対値として得られる。つまり、2種の蛍光ラベルしか利用できない従来のDNAマイクロアレイ実験では、多数の試料のデータを実験間で比較することが難しい。

【0063】しかしながら、別々の元素でラベルした3種類以上の複数のプローブを混合し、同時にターゲットとハイブリダイゼーションさせ、本発明によるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法で計測する多チャンネル化したDNAマイクロアレイを用いると、複数試料間のデータを比較することができる。

【0064】このように、本発明によって、多種類の安定同位元素標識による高感度・高速質量分析法を確立することができるものであり、従って、本発明は、蛍光色素や放射性同位元素で標識を行っている全ての研究分野\*

ピーク幅（パルス時間幅）：～110fs（フェムト秒）

出力：50～480μJ（マイクロジュール）

（尖頭値出力：0.5～4GW（ギガワット））

波長：～800nm（ナノメートル）

繰り返し：1kHz（キロヘルツ）

である。

【0070】なお、四重極質量分析器16は、超短パルスレーザー20から出射されてターゲット14に照射される超短パルスレーザー光の照射方向に対して、90度垂直方向に設置されている。

【0071】また、超短パルスレーザー20から出射された超短パルスレーザー光を集光するフォーカスレンズ22の焦点距離は、例えば、25cmに設定されている。

【0072】以上の構成において、上記した質量分析システム10を用いて実際に質量分析を行った実験結果について説明する。

【0073】まず、実験の試料として、図2に示す仕様の2種類のサンプル（サンプル1およびサンプル2）を用いた。そして、この2種類のサンプルを用いてターゲット14をスピンコート法により作成した。

【0074】即ち、まず、一辺が約2cmの略四角形状

\*へ応用可能である。

【0065】また、本発明によれば、標識元素に放射性同位元素を用いることなく、安定同位元素を用いることができるので、その場合には使用される施設に制限を受けないため、医療施設や民間企業への設置も可能となり、その波及効果は計り知れないものがある。

【0066】

【発明の実施の形態】以下、添付の図面を参照しながら、本発明によるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムの実施の形態の一例を詳細に説明するものとする。

【0067】図1には、本発明によるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法を実施するための高分子の分析システムの一例として、質量分析システムの構成の一例の概念構成説明図が示されている。

【0068】この質量分析システム10は、 $10^{-8} \sim 10^{-6}$  Torrの真空度に設定可能な真空槽12と、この真空槽12内に配置されたターゲット14と、真空槽12内に配置された四重極質量分析器16と、ターゲット14を回転する回転導入端子18と、超短パルスレーザー光を出射してターゲット14へ照射する超短パルスレーザー20と、超短パルスレーザー20から照射された超短パルスレーザー光をターゲット14上へ集光するフォーカスレンズ22とを有している。

【0069】ここで、超短パルスレーザー20は、チタンサファイアレーザーにより構成され、以下に示すようなパラメータを備えている。即ち、

のシリコン基板を用意し、その上にサンプル1またはサンプル2の濃い溶液をスポイトで滴下する。その後に、1000回転/秒で90秒間このシリコン基板を回転する。そうすることで、シリコン基板上に滴下されたサンプル1またはサンプル2の溶液は、広がりながら溶媒を蒸発させて固相化し、表面を平らに保ちながら硬化する。それから、表面にサンプル1またはサンプル2が硬化したシリコン基板を、さらに約120度の恒温槽に入れ、30分～1時間放置する。

【0075】この方法により、均一、かつ、超短パルスレーザー20から出射された超短パルスレーザー光の1ショットのスポット当たり $10^{13}$ 程度の濃度で、1cmφ以上の面積を覆うサンプル1またはサンプル2を形成したターゲット14を作ることができる。

【0076】ここで、基板の材質は半導体である必要はなく、金属や絶縁体であっても良い。超短パルスレーザー光を用いたレーザーアブレーションでは、熱伝導度の

高い基板が、より高いイオン検出効率を与える。なお、基板としては固体を用いるものであり、この基板として用いる固体の熱伝導率は $0.1 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 以上であることが好ましい。

【0077】上記のようにして作成したターゲット14を真空槽12内に装着して、真空槽12内を真空に引いて、真空槽12内の真空度が $10^{-6}$  Torr以下となるように設定する。

【0078】次に、超短パルスレーザー20から出射された超短パルスレーザー光を、フォーカスレンズ22を用いてターゲット14上に集光して、ターゲット14上に形成されたサンプル1またはサンプル2をアブレーションする。

【0079】なお、超短パルスレーザー20から出射される超短パルスレーザー光のパルス幅は110フェムト秒であり、出力は $53 \mu\text{J}$ 、 $230 \mu\text{J}$ 、 $480 \mu\text{J}$ に変化させた。

【0080】そして、四重極質量分析器16によって、ターゲット14への超短パルスレーザー光の照射により発生した一価のイオンの質量を測定する。

【0081】図3(a)(b)(c)には、上記した手法により、四重極質量分析器16によって測定されたサンプル1の質量スペクトラムが示されている。

【0082】短パルスレーザー光の出力を $53 \mu\text{J}$ (図3(b)参照)から $230 \mu\text{J}$ (図3(a)参照)にあげることによって、一価のイオンとなった $^{12}\text{C}$ 、 $^{16}\text{O}$ 、 $^{19}\text{F}$ をほぼ構成比に対応した量で検出することができた。

【0083】これにより、サンプル1の高分子は、フェムト秒レーザーなどの超短パルスレーザーによるアブレーションにより原子化され、その原子化と同時にイオン化されたことが確認された。

【0084】ここで、さらに短パルスレーザー光の出力を $480 \mu\text{J}$ にあげると、Cの割合が増加し、また、二価のシリコンイオンと思われるピークが顕著に現れてきた(図3(c)参照)。なお、図3(c)の測定に関しては、四重極質量分析器16の感度を図3(a)ならびに図3(b)の測定の場合よりも二桁下げて測定した。

【0085】次に、図4には、超短パルスレーザー光の照射によってサンプル1が剥ぎ取られたターゲット14の状態を示す顕微鏡写真が示されている。図4においては、同心円状に形成された二重円たる内側の白い円とその周りの外側の黒い円とが視認される。この1スポットは、シャッターの開放時間8msの照射に対応する。つまり、超短パルスレーザー光の約8ショット分のパルスによって剥ぎ取られたと言える。

【0086】図5は、ターゲット14に形成された傷の深さと面積とを測定した結果を示している。ここで、深さレベルB(Lv. B)がシリコン基板の表面と考えられ、深さ $8 \mu\text{m}$ 、幅 $224 \mu\text{m}$ の円筒内にあったサンプ

ル1と深さ $6 \mu\text{m}$ 、幅 $48 \mu\text{m}$ の円錐内のシリコンとが、8ショット分のパルスで剥ぎ取られたものと認められる。これから、超短パルスレーザー光の1ショットで剥ぎ取られたサンプルの量とシリコンの量とを見積もると、以下の結果となる。

【0087】即ち、超短パルスレーザー光の1ショットで剥ぎ取られたサンプルの量：

$$\left( \frac{224}{2} \right)^2 \pi \times 8 \times 10^{-12} [\text{cm}^3] \times 1 [\text{g/cm}^3] \times \{ (6.02 \times 10^{23}) / 1193 \} \div 8 = 2.0 \times 10^{13}$$

超短パルスレーザー光の1ショットで剥ぎ取られたシリコンの量：

$$\left( \frac{48}{2} \right)^2 \pi \times 6 \times 10^{-12} \times (1/3) [\text{cm}^3] \times 2.33 [\text{g/cm}^3] \times \{ (6.02 \times 10^{23}) / 28 \} \div 8 = 2.3 \times 10^{13}$$

上記したように、サンプル1に関する実験結果から、超短パルスレーザー光(具体的には、パルス時間幅が110フェムト秒のフェムト秒レーザー光である。)のアブレーションにより、高分子を原子化・イオン化することが可能であることが実証された。

【0088】次に、ラベルのついたDNAサンプルでの実験を行うために、サンプル2として市販のdATPを用いて、サンプル1の場合と同様にして実験を行った。

【0089】図6には、この実験により得られた質量スペクトラムが示されており、構成元素の $^{12}\text{C}$ 、 $^{14}\text{N}$ 、 $^{16}\text{O}$ 、 $^{23}\text{Na}$ 、 $^{31}\text{P}$ のピークを観測することができた。

【0090】この結果からも、超短パルスレーザー光(具体的には、パルス時間幅が110フェムト秒のフェムト秒レーザー光である。)のアブレーションにより、高分子(分子量500程度)も原子化・イオン化させることができることが確認できた。さらに、Pの同位元素をラベルとして用いることも可能であると言える。

【0091】以上のことから、高分子を高密度でシリコン基板上に塗布することにより、有機分子内の構成要素であるC、N、O、Na、F、Pなどを超短パルスレーザー光のアブレーションによって原子化・イオン化して検出できることが実証された。dATP内のPを検出できたことにより、Pの同位元素をラベルとして利用することができる。

【0092】次に、以下に示す試料(16族元素をもつDNAサンプルとして、S置換DNAサンプル)をサンプル3として用いるとともに、超短パルスレーザー20のパルス時間幅を110フェムト秒、尖頭値出力を2GWに設定した場合の実験結果について説明する。

【0093】サンプル3：2'-Deoxyadenosine 5'-O-(1-Thiotriphosphate)

化学式： $\text{C}_{10} \text{H}_{13} \text{N}_5 \text{O}_{11} \text{P}_3 \text{SNa}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$



このサンプル3の場合にも、サンプル1ならびにサンプル2に関する実験の場合と同様に、質量分析システム10により高分子の質量分析を行う前に、まず、ターゲット14として、質量分析の対象となる試料たる高分子（上記したS置換DNAサンプルである。）を溶媒に溶かした溶液をシリコン基板に塗布し、そのシリコン基板を摂氏50度の恒温槽内に約30分間放置し、シリコン基板に塗布された溶媒を蒸発させたものを準備する。

【0094】上記のようにして表面にサンプル3が硬化したターゲット14を真空槽12内に装着して、真空槽12内を真空に引いて、真空槽12内の真空度が10<sup>-6</sup> Torr以下となるように設定する。

【0095】次に、超短パルスレーザー20から出射された上記したパラメータを備えた超短パルスレーザー光を、フォーカスレンズ22を用いてターゲット14上に集光して、ターゲット14をアブレーションする。

【0096】回転導入端子18によりターゲット14を回転することにより、ターゲット14を遺漏・重複なくスポット状にアブレーションする。また、この際に、フォーカスレンズ22を移動しながらシャッターを開閉することにより、ターゲット14上をスポット状に遺漏・重複なくアブレーションすることができる。

【0097】そして、四重極質量分析器16によって、ターゲット14への超短パルスレーザー光の照射により発生した一価のイオンの質量を測定する。

【0098】図7には、上記した手法により、四重極質量分析器16によって測定された試料の質量スペクトラムの一例が示されている。

【0099】次に、以下に示す試料（17族元素をもつDNAサンプルとして、C1置換DNAサンプル）をサンプル4として用いるとともに、超短パルスレーザー20のパルス時間幅を110フェムト秒、尖頭値出力を2GWに設定した場合の実験結果について説明する。

【0100】サンプル4：5-Chloro-2'-Deoxyuridine  
化学式：C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

このサンプル4の場合にも、サンプル1ならびにサンプル2に関する実験の場合と同様に、質量分析システム10により高分子の質量分析を行う前に、まず、ターゲット14として、質量分析の対象となる試料たる高分子（上記したC1置換DNAサンプルである。）を溶媒に溶かした溶液をシリコン基板に塗布し、そのシリコン基板を摂氏50度の恒温槽内に約30分間放置し、シリコン基板に塗布された溶媒を蒸発させたものを準備する。

【0101】上記のようにして表面にサンプル4が硬化したターゲット14を真空槽12内に装着して、真空槽12内を真空に引いて、真空槽12内の真空度が10<sup>-6</sup> Torr以下となるように設定する。

【0102】次に、超短パルスレーザー20から出射された上記したパラメータを備えた超短パルスレーザー光

を、フォーカスレンズ22を用いてターゲット14上に集光して、ターゲット14をアブレーションする。

【0103】フォーカスレンズ22を移動しながらシャッターを開閉することにより、ターゲット14を遺漏・重複なくスポット状にアブレーションする。

【0104】そして、四重極質量分析器16によって、ターゲット14への超短パルスレーザー光の照射により発生した一価のイオンの質量を測定する。

【0105】図8には、上記した手法により、四重極質量分析器16によって測定された試料の質量スペクトラムの一例が示されている。

【0106】なお、本発明によるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析手法は、例えば、DNA、蛋白質、RNA、PNA、脂質、糖などの各種の高分子の質量分析に用いることが可能である。

【0107】また、これら各種の高分子に関しては、元素標識を付けたものも解析することができるのは勿論である。

【0108】即ち、超短パルスレーザーにより単数または複数の同位体元素で標識した蛋白、アルブミン、DNAなどの高分子をアブレーションすることにより、高分子構成元素を完全に原子イオン化し、イオン化した標識元素を質量分析することにより高分子の定量測定を行うことができる。これにより、多種類の同位体元素を標識として使用することができるようになる。従って、質量分析することができる高分子の対象範囲を飛躍的に広げることができるようになる。

【0109】つまり、本発明によって、同位体元素で標識した高分子試料それ自体を原子レベルでイオン化し、標識元素を検出することが可能となるから、質量分析可能な対象範囲を飛躍的に広げることができるようになる。例えば、DNAの標識として同位体元素を用いることが可能となり、標識の種類をたとえば安定同位体元素の数である270にも増やすことができる。これは、従来の標識法である蛍光法（2種類）や放射性同位元素（約10種類）と比較して、飛躍的に情報量を増やすことができる。

【0110】なお、上記した実施の形態においては、質量分析器として四重極質量分析器を用いるようにしたが、これに限られるものではないことは勿論であり、原子の飛行時間を測定することにより質量分析を行う飛行時間質量分析器を用いた場合には、一回のレーザー照射で複数の原子の質量分析を同時に行うことができる。また、質量分析器としてイオンサイクロトロン型フーリエ変換質量分析器を用いた場合にも、複数の原子の質量分析を同時に行うことが可能となる。

【0111】また、上記した実施の形態においては、高分子の分析手法として質量分析に関して説明したが、これに限られるものではないことは勿論であり、質量分析以外の分析に関して本発明を用いるようにしてもよい。

【0112】また、上記した実施の形態においては、ターゲット14を移動する移動手段として、ターゲット14を回転する回転導入端子18を用いたが、これに限られるものではないことは勿論であり、ターゲット14を載置可能な移動自在のテーブルなどの適宜の移動手段を用いるようにしてもよい。

【0113】また、上記した実施の形態においては、回転導入端子18を用いてターゲット14を回転することにより、ターゲット14を遺漏・重複なくアブレーションするようにしたが、これに限られるものではないことは勿論であり、超短パルスレーザー光のターゲットへの照射位置を移動する移動手段を設けるようにして、ターゲット14を遺漏・重複なくアブレーションするようにしてもよい。

【0114】

【発明の効果】本発明は、以上説明したように構成されているので、高分子を構成する構成原子の原子イオンを生成し、生成した原子イオンを分析するようにしたレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法およびそのシステムであって、高分解能の分析装置を要しないようにしたレーザーアブレーションを用いた高分子の質量分析方法およびそのシステムを提供することができるという優れた効果を奏する。ここで、より詳細には、例えば、質量分析を行う場合には、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除することができるとともに、高分解能の質量分析装置を必要とすることがないという優れた効果を奏する。

【0115】また、本発明は、以上説明したように構成されているので、システム構成を大幅に簡潔化することができるという優れた効果を奏する。

【0116】さらに、本発明は、以上説明したように構成されているので、多種類の標識同位体が混入した状況においても、効率の良い分析を行うことができるようになるという優れた効果を奏する。

\*【図面の簡単な説明】

【図1】本発明によるレーザーアブレーションを用いた高分子の分析方法を実施するための高分子の分析システムの一例たる質量分析システムの構成の一例の概念構成説明図である。

【図2】実験に用いた2種類のサンプル（サンプル1およびサンプル2）の仕様を示す図表である。

【図3】（a）（b）（c）は、四重極質量分析器によって測定されたサンプル1の質量スペクトラムである。

（a）は短パルスレーザー光の出力を230μJとした場合を示し、（b）は短パルスレーザー光の出力を53μJとした場合を示し、（c）は短パルスレーザー光の出力を480μJとした場合を示す。なお、（c）の測定に関しては、四重極質量分析器の感度を（a）ならびに（b）の測定の場合よりも二桁下げて測定した。

【図4】超短パルスレーザー光の照射によってサンプル1が剥ぎ取られたターゲットの状態を示す顕微鏡写真である。

【図5】ターゲットに形成された傷の深さと面積とを測定した結果を示す説明図である。

【図6】四重極質量分析器によって測定されたサンプル2の質量スペクトラムである。

【図7】四重極質量分析器によって測定されたサンプル3の質量スペクトラムである。

【図8】四重極質量分析器によって測定されたサンプル4の質量スペクトラムである。

【符号の説明】

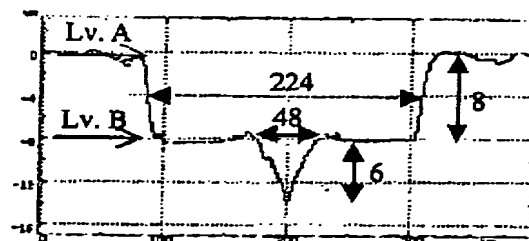
10 質量分析システム  
12 真空槽  
14 ターゲット  
16 四重極質量分析器  
18 回転導入端子  
20 超短パルスレーザー  
22 フォーカスレンズ

【図2】

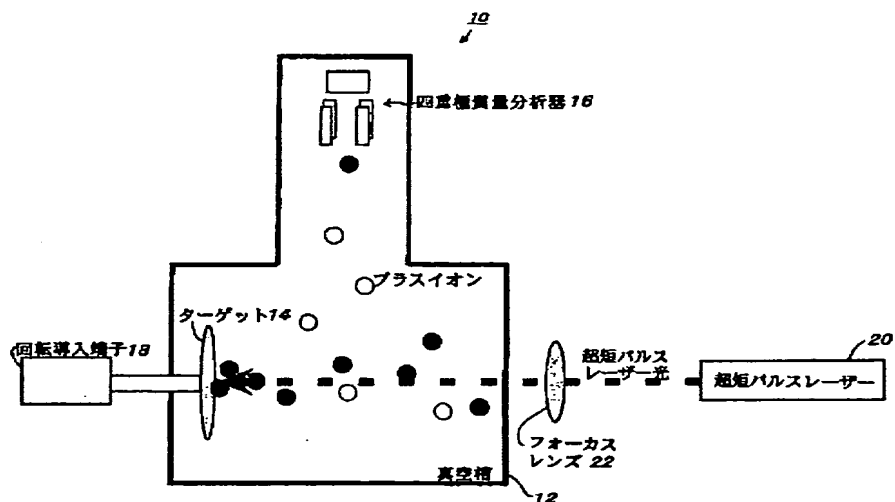
	サンプル1	サンプル2 (dATP)
化学式	$C_{10}H_{12}BuP_2O_6$	$C_{12}H_{12}N_2O_{12}P_2Na_4$
分子量	1193	579
溶媒	エタノール	水
濃度	0.7 mMol/l	100 mMol/l
散布量	0.0064 (g) (乾燥後)	100 (μl) (乾燥前)
耐熱温度	150 °C	-20 °C 半年 4 °C 0.5 % / month 20 °C 5 % / month 37 °C 1 % / day
分子数 / スポット	$2 \times 10^4$	
その他	溶質 : 5.5931 (g) 溶媒 : 5.6090 (g)で混合	

2種類のサンプルの仕様

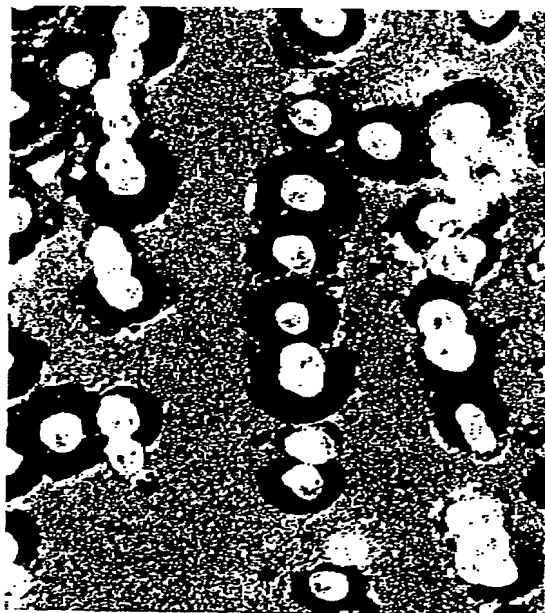
【図5】



【図1】

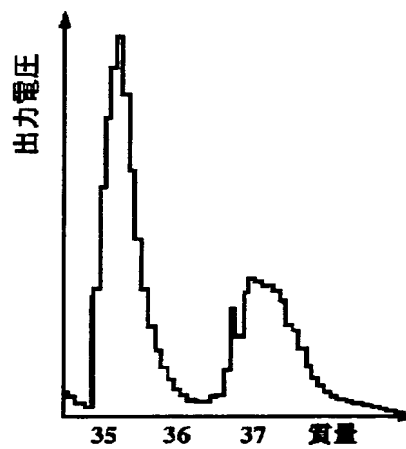


【図4】



【図8】

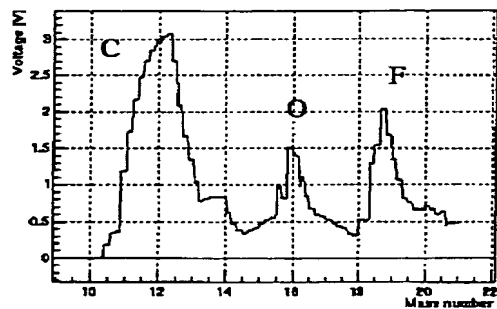
質量スペクトラム



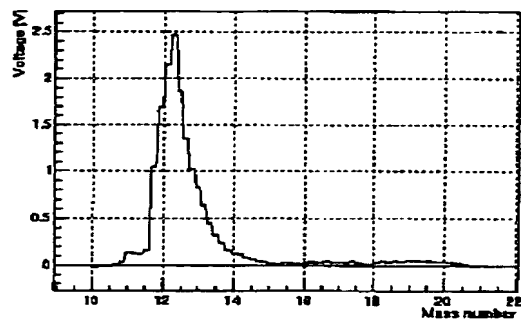
サンプル4 : 5-Chloro-2'-Deoxyuridine  
 化学式 :  $C_9H_{11}ClN_2O_5$

【図3】

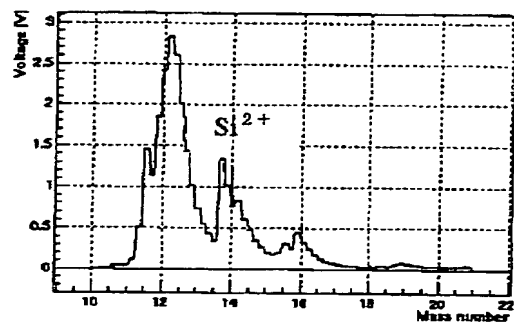
(a)



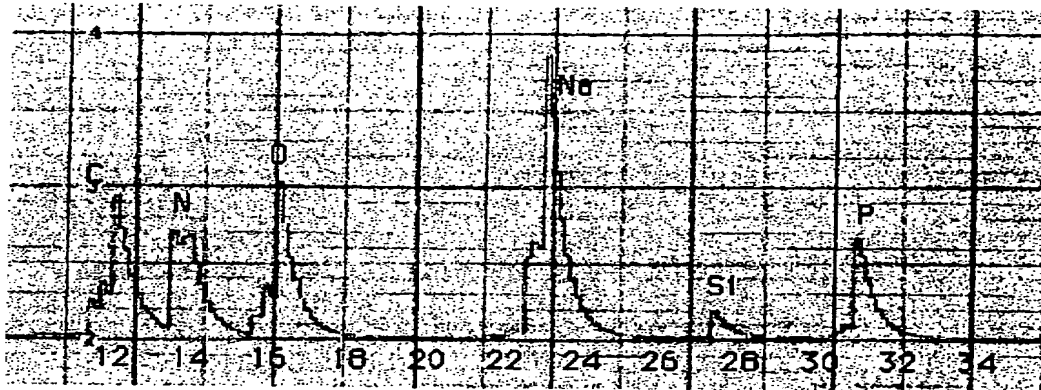
(b)



(c)

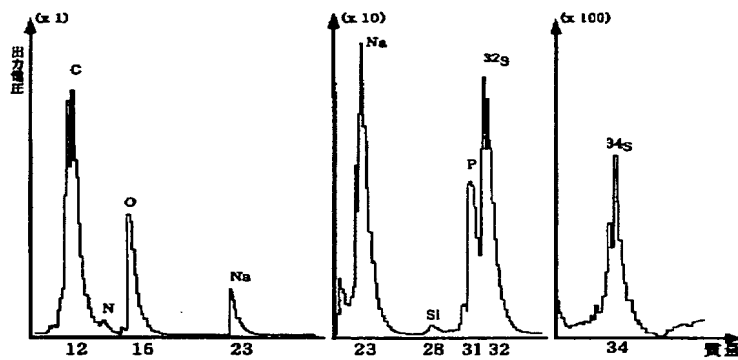


【図6】



【図7】

質量スペクトラム



サンプル 3 : 2'-Deoxyadenosine 5'-O-(1-Thiotriphosphate)

化学式:  $C_{10}H_{13}N_5O_{11}P_3SNa_3 \cdot 3H_2O$

レーザー尖頭値出力: 2 GW

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 37/00

1 0 2

G 0 1 N 37/00

1 0 2

H 0 1 J 49/10

H 0 1 J 49/10

49/40

49/40

49/42

49/42

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-328114

(43)Date of publication of application : 15.11.2002

(51)Int.Cl.

G01N 27/64  
 G01N 27/62  
 G01N 33/483  
 G01N 33/68  
 G01N 37/00  
 H01J 49/10  
 H01J 49/40  
 H01J 49/42

(21)Application number : 2002-044340

(71)Applicant : INST OF PHYSICAL &amp; CHEMICAL RES

(22)Date of filing : 21.02.2002

(72)Inventor : HAYASHIZAKI YOSHIHIDE  
TANIHATA ISAO

(30)Priority

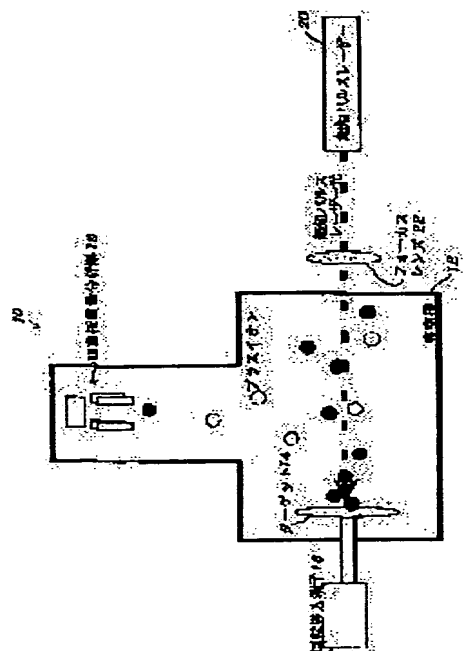
Priority number : 2001051919 Priority date : 27.02.2001 Priority country : JP

(54) METHOD OF ANALYZING POLYMER USING LASER ABRASION, AND SYSTEM THEREFOR

(57)Abstract

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To realize atomization and ionization of constitutive elements constituting a polymer concurrently by one laser to simplify system constitution remarkably.

**SOLUTION:** In this analytical method using laser abrasion wherein the polymer of an analyzing object is irradiated with a laser beam to abrade the polymer, wherein the polymer is atomized thereby into the constitutive elements, wherein the atomized the constitutive elements are ionized, and wherein the ionized constitutive elements are analyzed, the laser beam for irradiating the polymer of the analyzing object to abrade the polymer is a ultra-short pulse laser beam, the ultra-short pulse laser beam is emitted toward the polymer of the analyzing object to abrade the polymer, and the polymer is thereby atomized into the constitutive elements and ionized concurrently to analyze the ionized constitutive elements.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.02.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3640387

[Date of registration] 28.01.2005

[Number of appeal against examiner's decision of

rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

## CLAIMS

## [Claim(s)]

[Claim 1] By irradiating laser light and carrying out ablation of this giant molecule to the giant molecule which is an analytic object Atomize a macromolecule in a configuration element, and ionize the configuration element which atomized and the macromolecule which is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation which analyzes the ionized configuration element, and is an analytic object is irradiated. By irradiating the giant molecule which the laser light which carries out ablation of this giant molecule is ultrashort pulse laser light, and is the object of analysis of this ultrashort pulse laser light, and carrying out ablation of this giant molecule Analytical method of the macromolecule using the laser ablation which is what analyzes the configuration element which ionized while atomizing this macromolecule in the configuration element, and was ionized.

[Claim 2] The macromolecule which is an analytic object in the analytical method of the macromolecule using laser ablation according to claim 1 is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation solid-phase-ized.

[Claim 3] It is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation which is an approach including the solid-phase-ized process by dropping the solution of the macromolecule whose approach of solid-phase-izing of a macromolecule is the object of analysis on a substrate in the analytical method of the macromolecule using laser ablation according to claim 2, and drying.

[Claim 4] It is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation said whose substrate is a solid-state in the analytical method of the macromolecule using laser ablation according to claim 3 and whose heat conductivity of this solid-state is  $-1\text{--}K-1$  or more  $0.1\text{ W-m}$ .

[Claim 5] The macromolecule which is an analytic object in the analytical method of the macromolecule using laser ablation according to claim 1 is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation which attaches an element indicator.

[Claim 6] It is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation said whose element indicator is [ in / on the analytical method of the macromolecule using laser ablation according to claim 5, and / a periodic table ] 1 group element.

[Claim 7] It is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation said whose element indicator is [ in / on the analytical method of the macromolecule using laser ablation according to claim 5, and / a periodic table ] 16 group element.

[Claim 8] It is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation said whose element indicator is [ in / on the analytical method of the macromolecule using laser ablation according to claim 5, and / a periodic table ] 17 group element.

[Claim 9] It is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation said whose element indicator is [ in / on the analytical method of the macromolecule using laser ablation according to claim 5, and / a periodic table ] a transition-metals element.

[Claim 10] It is the analytical method of the giant molecule using the laser ablation said whose element indicator is a stable isotope indicator in the analytical method of the giant molecule using laser ablation according to claim 5.

[Claim 11] The ultrashort pulse laser light which irradiates the giant molecule which is an analytic object and carries out ablation of this giant molecule in the analytical method of the giant molecule using laser ablation given in any 1 term of claims 1-10 is the analytical method of the giant molecule using the laser ablation whose pulse period width of face is ten or less picoseconds and whose cusp value output is ten MW or more.

[Claim 12] The ultrashort pulse laser light which irradiates the giant molecule which is an analytic object and carries out ablation of this giant molecule in the analytical method of the giant molecule using laser ablation according to claim 11 is the analytical method of the giant molecule using the laser ablation whose pulse period width of face is one or less picosecond more than per femtosecond and whose cusp value output is 1GW or more 10GW or less.

[Claim 13] It is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation whose analysis of said ionized configuration element is mass analysis in the analytical method of the macromolecule using laser ablation given in any 1 term of claims 1-12.

[Claim 14] It is the analytical method of the giant molecule using the laser ablation whose mass analysis is the mass analysis according [ on the analytical method of the giant molecule using laser ablation according to claim 13, and ] to a TOF method.

[Claim 15] Analytical method of the macromolecule using the laser ablation which is what analyzes two or more ionized configuration elements to coincidence in the analytical method of the macromolecule using laser ablation



given in any 1 term of claims 1-14.

[Claim 16] The macromolecule which is an analytic object in the analytical method of the macromolecule using laser ablation given in any 1 term of claims 1-15 is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation which is the analog of the nucleic acid to which the DNA microarray was fixed, or a nucleic acid.

[Claim 17] It is the analytical method of the giant molecule using the laser ablation which is the DNA microarray which many channelized said DNA microarray in the analytical method of the giant molecule using laser ablation according to claim 16.

[Claim 18] The short pulse laser light which carries out ablation of the giant molecule to any 1 term of claims 1-17 in the analytical method of the giant molecule using the laser ablation of a publication, and the giant molecule which is an analytic object are the analytical method of the giant molecule using the laser ablation which analyzes by carrying out ablation of the giant molecule which is the object of this analysis without omission and duplication by the short pulse laser light which carries out ablation of this giant molecule by moving either at least.

[Claim 19] By irradiating laser light and carrying out ablation of this giant molecule to the giant molecule which is an analytic object It is the analysis system of the macromolecule using the laser ablation which atomizes a macromolecule in a configuration element, ionizes the configuration element which atomized and analyzes the ionized configuration element. The vacuum tub which can arrange a target inside, The analysis system of the macromolecule which has the analyzer arranged in said vacuum tub, and the ultrashort pulse laser irradiated to the target which carried out outgoing radiation of the ultrashort pulse laser light, and has been arranged in said vacuum tub.

[Claim 20] The analysis system of the macromolecule which has further a migration means to move a target into said vacuum tub, in the analysis system of a macromolecule according to claim 19.

[Claim 21] A migration means to move said target in the analysis system of a macromolecule according to claim 20 is the analysis system of the macromolecule which is a rotation means to rotate a target.

[Claim 22] The analysis system of the macromolecule which has further a migration means to move the exposure location to the target of ultrashort pulse laser light, in the analysis system of a macromolecule according to claim 19.

[Claim 23] It is the analysis system of the macromolecule said whose analyzer is a mass spectrograph in the analysis system of a macromolecule given in any 1 term of claims 19-22.

[Claim 24] It is the analysis system of the macromolecule said whose mass spectrograph is a quadrupole mass spectrograph in the analysis system of a macromolecule according to claim 23.

[Claim 25] It is the analysis system of the macromolecule said whose mass spectrograph is a time-of-flight mass spectrograph in the analysis system of a macromolecule according to claim 23.

[Claim 26] It is the analysis system of the macromolecule said whose mass spectrograph is the amount analyzer of ion cyclotron mold fourier strange obversions in the analysis system of a macromolecule according to claim 23.

[Claim 27] Said ultrashort pulse laser is the analysis system of the macromolecule which irradiates the short pulse laser light whose pulse period width of face is ten or less picoseconds in the analysis system of a macromolecule given in any 1 term of claims 19-26, and whose cusp value output is ten MW or more.

[Claim 28] Said ultrashort pulse laser is the analysis system of the macromolecule which pulse period width of face is one or less picosecond more than per femtosecond in the analysis system of a macromolecule according to claim 27, and irradiates the short pulse laser light whose cusp value output is 1GW or more 10GW or less.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] About the analytical method of the macromolecule which used laser ablation, and its system, concerning the analytical method of the macromolecule using the laser ablation which made it possible to improve analytic effectiveness remarkably in a detail as compared with the former, and its system, further, this invention is used for the mass analysis of various kinds of macromolecules, such as DNA, protein, RNA and PNA, a lipid, and sugar, and relates to the analytical method of the macromolecule using suitable laser ablation, and its system.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, the application range of a mass spectrometry is spreading from the field of physics or chemistry quickly to the field of life sciences, such as medicine and biochemistry. Especially, development to the decision calculus of proteinic molecular weight, the decision calculus of an amino acid sequence, etc. is astonishing.

[0003] A sample is ionized by various approaches, and the principle of such a mass spectrometry separates the ion obtained by ionization according to mass/charge, and measures the reinforcement of each separated ion.

[0004] By the way, an electron is added and ionized to the macromolecule itself, the molecule of the amount of macromolecules is subdivided in the molecular ion of low molecular weight, and the mass analysis of the conventional macromolecule performs [ the mass is analyzed, or ] mass analysis, and compared the component.

[0005] the secondary ion mass analysis (SIMS) which high energy atom ion is made to collide with a macromolecule, and is ionized as an ion generation method in the mass analysis of the conventional macromolecule here, for example — law and the electronic ionization (ED) which subdivides in the molecular ion of low molecular weight, and performs mass analysis by electron impact — law and matrix exchange laser ionization (MALDI) — law etc. is known.

[0006] However, also in which the above-mentioned approach, in order to carry out mass analysis of the macromolecule ion, there were a trouble that the mass spectroscopy of a high resolution is required, a trouble that the existence of fragment ion which carried out decomposition generation halfway made analysis of a mass spectrum difficult, etc.

[0007] the laser atomization resonance ionization (LARIMP) which performs atomization and ionization with nanosecond laser conventionally on the other hand, for example as the mass analysis approach of the macromolecule sample which carried out the indicator with the isotope on the occasion of the chemical analysis — law is known.

[0008] However, since two sets of laser with the resonance ionization laser for ionizing the atom of the atomization laser for atomizing a labelled atom and the atomized labelled atom as laser were needed according to this LARIMP method, there was a trouble that a system configuration became complicated.

[0009] Furthermore, in the LARIMP method, as described above, it is necessary to carry out resonance ionization of the tagged atom. For this reason, the laser light of the wavelength of a proper needed to be irradiated to each tagged atom, and there was a trouble that it was very difficult to perform efficient analysis, in the situation which the indicator isotope of varieties mixed.

[0010]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The place which this invention is made in view of the various troubles which a Prior art which was described above has, and is made into the purpose They are the analytical method of the macromolecule using the laser ablation which generates the atomic ion of the configuration atom which constitutes a macromolecule, and analyzed the generated atomic ion, and its system. It is going to offer the mass analysis approach of the macromolecule using the laser ablation it was made not to require the analysis apparatus of a high resolution, and its system. More, in performing mass analysis, while eliminating a possibility that the analysis of a mass spectrum may become difficult, it is going to provide a detail with the mass analysis approach of the macromolecule using the laser ablation it was made for a mass spectroscopy not to take a high resolution to, and its system.

[0011] Moreover, the place made into the purpose of this invention tends to offer the analytical method of the macromolecule using the laser ablation which made it possible to realize to coincidence atomization and ionization of the configuration atom which constitutes a macromolecule by one set of laser, and made it possible to compact a system configuration sharply, and its system.

[0012] Furthermore, the place made into the purpose of this invention tends to offer the analytical method of the macromolecule using the laser ablation which made it possible to perform efficient analysis, and its system also in the situation which the indicator isotope of varieties mixed.

[0013]

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned purpose, by carrying out ablation of various kinds of macromolecules, such as DNA, protein, RNA and PNA, a lipid, and sugar, with ultrashort pulse laser light, the analytical method of the macromolecule using the laser ablation by this invention and its system carry out atom ionization of these macromolecules, and analyze the atomic ion which generated and generated atomic ion. Thereby, the chemical analysis of various kinds of macromolecules can be performed.

[0014] That is, quantitative analysis becomes possible by ionizing the atom which atomized to univalent ion and analyzing the atomic ion generated by this ionization at the same time it atomizes for each [ which disassembles a giant molecule scatteringly and constitutes the giant molecule concerned by carrying out ablation of the giant molecule with ultrashort pulse laser light ] atom of every according to the analytical method of the giant molecule using the laser ablation of this invention, and its system.

[0015] When performing mass analysis in the analytical method of the macromolecule using the laser ablation of this invention, and its system, mass analysis of the atomic ion of a low quality amount will be carried out, and it becomes unnecessary a possibility that the analysis of a mass spectrum may become difficult not only to disappear, but therefore, to equip a mass spectroscopy with a high resolution.

[0016] moreover, as described above, according to the analytical method of the giant molecule using the laser ablation of this invention, and its system, it becomes possible by carrying out ablation of the giant molecule with ultrashort pulse laser light to perform efficiently atomization of a giant molecule, simultaneously ionization to the atomized ion of atomic monovalence. Therefore, since it becomes possible to use the labelled atom of varieties for coincidence on the occasion of a chemical analysis, for example while being able to compact a system configuration now, analysis effectiveness can be raised remarkably.

[0017] That is, in the analytical method of the macromolecule using the laser ablation of this invention, and its system, since one set of ultrashort pulse laser can perform atomization and ionization of a labelled atom to coincidence, it becomes possible to simplify a system configuration sharply.

[0018] Furthermore, since it is ionization (off-resonance ionization) performed by the off-resonance process with the high cusp value reinforcement of ultrashort pulse laser light, the above-mentioned ionization can ionize each tagged atom also in the situation which the indicator isotope of varieties mixed, respectively, and the application to a multi-indicator system can be easy for it, and it can analyze a highly precise and efficient macromolecule.

[0019] For this reason, the analytical method of the macromolecule using the laser ablation of this invention and its system are used for the quantitative analysis of the amount of gene expression which will increase importance increasingly from now on etc., and are very suitable.

[0020] Among this inventions, namely, invention according to claim 1 By irradiating laser light and carrying out ablation of this giant molecule to the giant molecule which is an analytic object Atomize a macromolecule in a configuration element, and ionize the configuration element which atomized and the macromolecule which is the analytical method of the macromolecule using the laser ablation which analyzes the ionized configuration element, and is an analytic object is irradiated. By irradiating the giant molecule which the laser light which carries out ablation of this giant molecule is ultrashort pulse laser light, and is the object of analysis of this ultrashort pulse laser light, and carrying out ablation of this giant molecule The configuration element which ionized while atomizing this macromolecule in the configuration element, and was ionized is analyzed.

[0021] Here, as the above-mentioned analysis, although mass analysis can be mentioned, specifically, chemical analysis (the so-called usual chemical analysis) and optical analysis (fluorescence method etc.) are mentioned as analysis of those other than mass analysis, for example.

[0022] Moreover, the macromolecule whose invention according to claim 2 is [ in / among this inventions / invention according to claim 1 ] an analytic object is [ solid-phase- ] made to beized among this inventions.

[0023] Moreover, when the approach of solid-phase-izing of a macromolecule trickles the solution of the macromolecule which is an analytic object and dries on a substrate, it is made for invention according to claim 3 to be an approach including the solid-phase-ized process in invention according to claim 2 among this inventions among this inventions.

[0024] Moreover, in invention according to claim 3, the above-mentioned substrate of invention according to claim 4 is a solid-state among this inventions among this inventions, and it is made for the thermal conductivity of this solid-state to be  $-1\text{--}K^{-1}$  or more  $0.1\text{--}W\text{--}m$ .

[0025] Moreover, the macromolecule whose invention according to claim 5 is [ in / among this inventions / invention according to claim 1 ] an analytic object should attach the element indicator among this inventions.

[0026] Moreover, invention according to claim 6 uses the above-mentioned element indicator as 1 group element in the periodic table in invention according to claim 5 among this inventions among this inventions.

[0027] Moreover, invention according to claim 7 uses the above-mentioned element indicator as 16 group element in the periodic table in invention according to claim 5 among this inventions among this inventions.

[0028] Moreover, invention according to claim 8 uses the above-mentioned element indicator as 17 group element in the periodic table in invention according to claim 5 among this inventions among this inventions.

[0029] Moreover, invention according to claim 9 uses the above-mentioned element indicator as a transition-metals element in the periodic table in invention according to claim 5 among this inventions among this inventions.

[0030] Moreover, it is made for the above-mentioned element indicator of invention according to claim 10 to be a stable isotope indicator in invention according to claim 5 among this inventions among this inventions.

[0031] Moreover, pulse period width of face is ten or less picoseconds, and it is made for the cusp value output of the ultrashort pulse laser light which invention according to claim 11 irradiates the giant molecule which is an analytic object in invention given in any 1 term of claims 1-10 among this inventions among this inventions, and carries out ablation of this giant molecule to be ten MW or more.

[0032] Moreover, pulse period width of face is one or less picosecond more than per femtosecond, and it is made for the cusp value output of the ultrashort pulse laser light which invention according to claim 12 irradiates the giant molecule which is an analytic object in invention according to claim 11 among this inventions among this inventions, and carries out ablation of this giant molecule to be 1GW or more 10GW or less.

[0033] Moreover, it is made for analysis of the configuration element which carried out [ in / among this inventions / invention given in any 1 term of claims 1-12 / above-mentioned ] ionization of the invention according to claim 13 to be mass analysis among this inventions.

[0034] Moreover, it is made for invention according to claim 14 to be the mass analysis according [ mass analysis ] to a TOF method in invention according to claim 13 among this inventions among this inventions.

[0035] Moreover, invention according to claim 15 analyzes two or more ionized configuration elements to coincidence in invention given in any 1 term of claims 1-14 among this inventions among this inventions.

[0036] Moreover, it is made for the macromolecule whose invention according to claim 16 is [ in / among this inventions / invention given in any 1 term of claims 1-15 ] an analytic object to be the analog of the nucleic acid to which the DNA microarray was fixed, or a nucleic acid among this inventions.

[0037] In addition, specifically as an analog of a nucleic acid or a nucleic acid, DNA, RNA, and PNA are mentioned.

[0038] Moreover, it is made for invention according to claim 17 to be the DNA microarray which many channelized the above-mentioned DNA microarray in invention according to claim 16 among this inventions among this inventions.

[0039] Moreover, among this inventions, invention according to claim 18 is made to analyze by carrying out ablation of the giant molecule which is the object of this analysis without omission and duplication by the short pulse laser light which carries out ablation of this giant molecule, when the short pulse laser light which carries out ablation of the giant molecule to any 1 term of claims 1-17 in invention of a publication among this inventions, and the giant molecule which is an analytic object move either at least.

[0040] Among this inventions, moreover, invention according to claim 19 By irradiating laser light and carrying out ablation of this giant molecule to the giant molecule which is an analytic object It is the analysis system of the macromolecule using the laser ablation which atomizes a macromolecule in a configuration element, ionizes the configuration element which atomized and analyzes the ionized configuration element. The vacuum tub which can arrange a target inside, It is made to have the analyzer arranged in the above-mentioned vacuum tub, and the ultrashort pulse laser irradiated to the target which carried out outgoing radiation of the ultrashort pulse laser light, and has been arranged in the above-mentioned vacuum tub.

[0041] Moreover, it is made for invention according to claim 20 to have further a migration means to move a target into the above-mentioned vacuum tub, in invention according to claim 19 among this inventions among this inventions.

[0042] Moreover, it is made for a migration means by which invention according to claim 21 moves [ in / among this inventions / invention according to claim 20 ] the above-mentioned target to be a rotation means to rotate a target, among this inventions.

[0043] Moreover, it is made for invention according to claim 22 to have further a migration means to move the exposure location to the target of ultrashort pulse laser light, in invention according to claim 19 among this inventions among this inventions.

[0044] Moreover, it is made for the above-mentioned analyzer of invention according to claim 23 to be a mass spectrograph in invention given in any 1 term of claims 19-22 among this inventions among this inventions.

[0045] Moreover, it is made for the above-mentioned mass spectrograph of invention according to claim 24 to be a quadrupole mass spectrograph in invention according to claim 23 among this inventions among this inventions.

[0046] Moreover, it is made for the above-mentioned mass spectrograph of invention according to claim 25 to be a time-of-flight mass spectrograph in invention according to claim 23 among this inventions among this inventions.

[0047] Moreover, it is made for the above-mentioned mass spectrograph of invention according to claim 26 to be the amount analyzer of ion cyclotron mold fourier strange obversions in invention according to claim 23 among this inventions among this inventions.

[0048] Moreover, pulse period width of face is ten or less picoseconds, and it is made, as for invention according to claim 27, for a cusp value output to irradiate the short pulse laser light which is ten MW or more in invention given in any 1 term of claims 19-26 among this inventions among this inventions as for the above-mentioned ultrashort pulse laser.

[0049] Moreover, pulse period width of face is one or less picosecond more than per femtosecond, and it is made, as for invention according to claim 28, for a cusp value output to irradiate the 1GW or more short pulse laser light which is 10GW or less in invention according to claim 26 among this inventions among this inventions as for the above-mentioned ultrashort pulse laser.

[0050] Here, in case ablation of the giant molecule is carried out by ultrashort pulse laser light in this invention, if the one-shot (one pulse) exposure of the ultrashort pulse laser light is carried out, it is enough for a giant molecule.

However, what is necessary is to carry out two or more shot (two or more pulses) exposure of the ultrashort pulse laser light, and just to choose suitably the shots per hour (pulse number) of the ultrashort pulse laser light to a macromolecule to irradiate as a macromolecule.

[0051] Moreover, as for ultrashort pulse laser, it is desirable that pulse period width of face is ten or less picoseconds, and it is appropriate for especially 1-femtosecond or more usual [ of one or less picosecond ] to use the laser called femtosecond laser. As the cusp value output, ten MW or more is desirable and 1GW or more 10GW or less is desirable especially.

[0052] It is because multicharged ion will be generated if larger than this range, analysis of a mass spectrum cannot become difficult, effectiveness of atomization and ionization cannot fall if it is less than [ this ], and an atomic ion signal cannot be observed.

[0053] In addition, according to the experiment by the artificer who mentions later, when pulse period width of face was 110 femtoseconds and the cusp value output of 2GW, the very good result was able to be obtained, for example.

[0054] Moreover, he is trying to irradiate the macromolecule sample which carried out the indicator of the ultrashort pulse laser light, such as femtosecond laser light which can ionize efficiently to atomization and coincidence, with the isotope according to this invention. For this reason, the need of ionizing a labelled atom alternatively is lost and it becomes possible to use various labelled atoms variously. Since it is possible to raise the repeat rate of laser radiation to several kHz moreover, it is suitable for high-speed analysis.

[0055] Moreover, in this invention, the short pulse laser light which carries out ablation of the giant molecule, and the giant molecule which is an analytic object are made to analyze by moving either at least by carrying out ablation of the giant molecule which is the object of this analysis without omission and duplication by the short pulse laser light which carries out ablation of this giant molecule. That is, in this invention, it makes it possible to carry out ablation of the sample of a large number applied by migration with the substrate which applied the macromolecule which is the object of the analysis as the spot and sample of short pulse laser light covering a large area, for example, without omitting and overlapping. Especially this is effective in the application to a DNA microarray.

[0056] this invention — these descriptions to an analysis rate — the former — comparing — markedly — alike — early — about — it makes it possible to perform coincidence analysis of very little gene expression of the amount of manifestations.

[0057] And for example, there is gene expression analysis using the DNA microarray as a concrete application of this invention, and it becomes possible to accelerate the analysis. That is, according to this invention, it becomes possible to use the isotope of varieties as an indicator, and as an indicator, if a stable isotope is used, the class of indicator can be increased also in the number of the stable isotopes of varieties (270 kinds). This can increase amount of information by leaps and bounds as compared with the fluorescence method (2-6 kinds) and radioisotope (about ten kinds) which are the conventional indicator method.

[0058] In the periodic table, 35Cl(s) which are 17 groups' stable isotopes, 37Cl, etc. are used more for it as an indicator used in a DNA microarray experiment in the periodic tables, such as 32S, 35S, etc. which are 16 groups' stable isotope, in the periodic tables, such as 39K, 41K, etc. which are one group's stable isotope, carrying out the indicator of the probe to a detail by the nucleotide which contains stable isotopes which are the stable isotopes of transition metals, such as 118Sn and 120Sn, in the periodic table.

[0059] After carrying out hybridization of the probe to the target nucleic acid on a DNA microarray, ablation is carried out by ultrashort pulse laser, atom ionization of a molecule is performed, and if a mass spectrograph detects, the quantum of the amount of the isotope contained in the probe which carried out hybridization can be carried out after that. Therefore, it can calculate and ask for the quantitative ratio of a probe.

[0060] Here, in the conventional DNA microarray technique, the indicator of the probe was carried out by the fluorochrome. Exclusive detection equipment was used for the detection after hybridization, and such a conventional approach had taken 10-minute room [ about ] time amount. However, if this invention is used, improvement in the speed can be attained.

[0061] Moreover, the number of the fluorochromes by which current use is carried out is only two (Cy-3, Cy-5), and the present condition is being unable to expect a rapid increment. If a stable isotope is used as opposed to it, the class of indicator can be increased also to 270 sorts.

[0062] Moreover, the gene expression data of a DNA microarray are obtained as a relative value to the sample for reference. That is, it is difficult to be between experiments and to compare the data of many samples in the conventional DNA microarray experiment which can use only two sorts of fluorescence labels.

[0063] However, mix three or more kinds of two or more probes which carried out the label by the separate element, and coincidence is made to carry out hybridization to a target, and if the many channelized DNA microarray which is measured by the analytical method of the giant molecule using the laser ablation by this invention is used, the data between two or more samples can be compared.

[0064] Thus, high sensitivity and a high-speed mass spectrometry with the stable isotope indicator of varieties can be established by this invention, and it can apply to all the areas of research to which this invention is performing the indicator with a fluorochrome or radioisotope.

[0065] Moreover, since a stable isotope can be used, in order not to receive a limit in the facility used in that case according to this invention, without using radioisotope for a labelled atom, establishment of medical facilities and private enterprises also becomes possible, and the repercussion effect has an unfathomable thing.

[0066]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, while referring to an attached drawing, an example of the analytical method of the macromolecule using the laser ablation by this invention and the gestalt of operation of the system shall be explained to a detail.

[0067] The conceptual configuration explanatory view of an example of the mass analysis structure of a system is shown in drawing 1 as an example of the analysis system of the macromolecule for enforcing analytical method of the macromolecule using the laser ablation by this invention.

[0068] The vacuum tub 12 which can set this mass analysis system 10 as the degree of vacuum of  $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  Torr. The target 14 arranged in this vacuum tub 12, and the quadrupole mass spectrograph 16 arranged in the vacuum tub 12. The rotation installation terminal 18 turning around a target 14, and the ultrashort pulse laser 20 to which outgoing radiation of the ultrashort pulse laser light is carried out and which is irradiated to a target 14. It has the focal lens 22 which condenses the ultrashort pulse laser light irradiated from the ultrashort pulse laser 20 to up to a target 14.

[0069] Here, the ultrashort pulse laser 20 was constituted by titanium sapphire laser, and is equipped with the parameter as shown below. namely, — peak width (pulse period width of face):  $\sim 110$ fs (femtosecond)

Output : 50–480microJ (micro joule)

(Cusp value output: 0.5–4GW (gigawatt))

wavelength :  $\sim 800$ nm (nano meter)

Repeat : 1kHz (kilohertz)

It comes out.

[0070] In addition, the quadrupole mass spectrograph 16 is perpendicularly installed 90 degrees to the direction of radiation of the ultrashort pulse laser light to which outgoing radiation is carried out from the ultrashort pulse laser 20 and which is irradiated by the target 14.

[0071] Moreover, the focal distance of the focal lens 22 which condenses the ultrashort pulse laser light by which outgoing radiation was carried out from the ultrashort pulse laser 20 is set as 25cm.

[0072] In the above configuration, the experimental result which actually performed mass analysis using the above-mentioned mass analysis system 10 is explained.

[0073] First, two kinds of samples (a sample 1 and sample 2) of the specification shown in drawing 2 were used as a sample of an experiment. And the target 14 was created with the spin coat method using two kinds of this sample.

[0074] That is, first, one side prepares the silicon substrate of the shape of an abbreviation square which is about 2cm, and trickles the deep solution of a sample 1 or a sample 2 by the syringe on it. After that, this silicon substrate is rotated for 90 seconds by 1000 revolutions per second. The solution of the sample 1 dropped on the silicon substrate by doing so or a sample 2 evaporates a solvent with breadth, is solid-phase-ized, and it is hardened, maintaining a front face at Taira and others. And the silicon substrate which the sample 1 or the sample 2 hardened on the front face is further put into the thermostat of about 120 degrees, and is left for 30 minutes to 1 hour.

[0075] By this approach, the target 14 which formed the wrap sample 1 or the sample 2 for the area more than 1cmphi can be made from about [ per spot of one shot of homogeneity and the ultrashort pulse laser light by which outgoing radiation was carried out from the ultrashort pulse laser 20 ]  $10^{13}$  concentration.

[0076] Here, the quality of the material of a substrate does not need to be a semi-conductor, and may be a metal and an insulator. In the laser ablation using ultrashort pulse laser light, a substrate with high thermal conductivity gives higher ion detection efficiency. In addition, as for the thermal conductivity of the solid-state used as this substrate, using a solid-state as a substrate, it is desirable that they are  $\sim 1$ -K-1 or more 0.1 W-m.

[0077] It equips with the target 14 created as mentioned above in the vacuum tub 12, and the inside of the vacuum tub 12 is lengthened to a vacuum, and it sets up so that the degree of vacuum in the vacuum tub 12 may be set to 10 to 6 or less Torrs.

[0078] Next, the ultrashort pulse laser light by which outgoing radiation was carried out from the ultrashort pulse laser 20 is condensed on a target 14 using the focal lens 22, and ablation of the sample 1 or sample 2 formed on the target 14 is carried out.

[0079] In addition, the pulse width of the ultrashort pulse laser light by which outgoing radiation is carried out from the ultrashort pulse laser 20 is 110 femtoseconds, and the output was changed to 53microJ, 230microJ, and 480microJ.

[0080] And the mass of the ion of monovalence generated by the exposure of the ultrashort pulse laser light to a target 14 is measured with the quadrupole mass spectrograph 16.

[0081] The mass spectrum of the sample 1 measured by the quadrupole mass spectrograph 16 is shown in drawing 3 (a), (b), and (c) by the above-mentioned technique.

[0082] 12C, 16O, and 19F which became the ion of monovalence by raising the output of short pulse laser light to 230microJ (referring to drawing 3 (a)) from 53microJ (referring to drawing 3 (b)) were mostly detectable in the amount corresponding to percentage.

[0083] Thereby, the giant molecule of a sample 1 was atomized by the ablation by ultrashort pulse laser, such as femtosecond laser, and what was ionized by the atomization and coincidence was checked.

[0084] Here, if the output of short pulse laser light is further raised to 480microJ, the peak which the rate of C increases and is considered to be the silicon ion of bivalence will have appeared notably (refer to drawing 3 (c)). In addition, about measurement of drawing 3 (c), rather than the case of measurement of drawing 3 (a) and drawing 3 (b), the double figures sensibility of the quadrupole mass spectrograph 16 was lowered, and was measured.

[0085] Next, the microphotography in which the condition of a target 14 that the sample 1 was stripped off by the exposure of ultrashort pulse laser light is shown is shown in drawing 4. In drawing 4, the white circle of the duplex circle slack inside formed in concentric circular and the black circle of the outside around it are checked by looking. This one spot corresponds to the exposure of 8ms of released times of a shutter. That is, it was stripped off by the pulse for about eight shots of ultrashort pulse laser light, and can say.

[0086] Drawing 5 shows the result of having measured the depth and area of the blemish formed in the target 14. Here, the depth level B (Lv.B) is considered to be the front face of a silicon substrate, and the silicon in a cone with a depth of 8 micrometers, a depth [ the sample 1 which was in the cylinder with a width of face of 224 micrometers and a depth of 6 micrometers ], and a width of face of 48 micrometers is accepted to be what was stripped off by the pulse for eight shots. The following results will be brought if the amount of a sample and the amount of silicon which were stripped off by one shot of ultrashort pulse laser light will be estimated from now on.

[0087] that is Amount of the sample stripped off by one shot of ultrashort pulse laser light : amount:(48/2)  $2\pi \times 6 \times 10^{-12} \times (224/2) \times 2\pi \times 8 \times 10^{-12} [\text{cm}^3] \times 1$  — the silicon stripped off by one shot of  $[\text{g}/\text{cm}^3] \times \{(6.02 \times 10^{23}) / 1193\} / 8 = 2.0 \times 10^{13}$  ultrashort-pulse laser light (1/3) As described above  $[\text{cm}^3] \times 2.33 [\text{g}/\text{cm}^3] \times \{(6.02 \times 10^{23}) / 28\} / 8 = 2.3 \times 10^{13}$  From the experimental result about a sample 1 to ultrashort pulse laser light (specifically, pulse period width of face is the femtosecond laser light which is 110 femtoseconds.) It was proved by ablation that it is possible to atomize and ionize a macromolecule.

[0088] Next, in order to conduct an experiment with the DNA sample which the label attached, it experimented like the case of a sample 1 using commercial dATP as a sample 2.

[0089] The mass spectrum obtained by this experiment is shown in drawing 6, and 12C, 14N and 16O of a configuration element, 23Na, and the peak of 31P were able to be observed.

[0090] Also from this result, it has checked that a macromolecule (about 500 molecular weight) could also be made to atomize and ionize by the ablation of ultrashort pulse laser light (specifically, pulse period width of face is the femtosecond laser light which is 110 femtoseconds.). Furthermore, it can say that it is also possible to use the isotope of P as a label.

[0091] It was proved that C, N, O, Na, F, P, etc. which are the component of organic intramolecular by applying a macromolecule on a silicon substrate by high density were atomized and ionized, and could be detected by the ablation of ultrashort pulse laser light from the above thing. By P in dATP having been detectable, the isotope of P can be used as a label.

[0092] Next, while using the sample (it is an S permutation DNA sample as a DNA sample with 16 group element) shown below as a sample 3, the experimental result at the time of setting a cusp value output as 2GW for the pulse period width of face of the ultrashort pulse laser 20 110 femtosecond is explained.

[0093] Sample 3: 2'-Deoxyadenosine 5'-O - (1-Thiotriphosphate)

Chemical formula :  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}_3\text{SNa}_3.3\text{H}_2\text{O}$  also in the case of this sample 3 The sample slack macromolecule first set as the object of mass analysis as a target 14 like the case of the experiment about a sample 1 and a sample 2 before the mass analysis system 10 performs mass analysis of a macromolecule (it is the above-mentioned S permutation DNA sample.) The solution melted into a solvent is applied to a silicon substrate, the silicon substrate is left for about 30 minutes in the thermostat of 50-degree Centigrade, and what evaporated the solvent applied to the silicon substrate is prepared.

[0094] It equips with the target 14 which the sample 3 hardened on the front face as mentioned above in the vacuum tub 12, and the inside of the vacuum tub 12 is lengthened to a vacuum, and it sets up so that the degree of vacuum in the vacuum tub 12 may be set to 10 to 6 or less Torrs.

[0095] Next, an ultrashort pulse laser light equipped with the above-mentioned parameter by which outgoing radiation was carried out from the ultrashort pulse laser 20 is condensed on a target 14 using the focal lens 22, and ablation of the target 14 is carried out.

[0096] By rotating a target 14 with the rotation installation terminal 18, ablation of the target 14 is carried out to the shape of a spot without omission and duplication. Moreover, ablation of the target 14 top can be carried out to the shape of a spot without omission and duplication by opening and closing a shutter, moving the focal lens 22 in this case.

[0097] And the mass of the ion of monovalence generated by the exposure of the ultrashort pulse laser light to a target 14 is measured with the quadrupole mass spectrograph 16.

[0098] An example of the mass spectrum of the sample measured by the quadrupole mass spectrograph 16 is shown in drawing 7 by the above-mentioned technique.

[0099] Next, while using the sample (it is a Cl permutation DNA sample as a DNA sample with 17 group element) shown below as a sample 4, the experimental result at the time of setting a cusp value output as 2GW for the pulse period width of face of the ultrashort pulse laser 20 110 femtosecond is explained.

[0100] sample 4: 5-Chloro-2'-Deoxyuridine chemical formula: —  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_5$  — also in the case of this sample 4 The sample slack macromolecule first set as the object of mass analysis as a target 14 like the case of the experiment about a sample 1 and a sample 2 before the mass analysis system 10 performs mass analysis of a macromolecule (it is the above-mentioned Cl permutation DNA sample.) The solution melted into a solvent is applied to a silicon substrate, the silicon substrate is left for about 30 minutes in the thermostat of 50-degree Centigrade, and what evaporated the solvent applied to the silicon substrate is prepared.

[0101] It equips with the target 14 which the sample 4 hardened on the front face as mentioned above in the vacuum tub 12, and the inside of the vacuum tub 12 is lengthened to a vacuum, and it sets up so that the degree of

vacuum in the vacuum tub 12 may be set to 10 to 6 or less Torrs.

[0102] Next, an ultrashort pulse laser light equipped with the above-mentioned parameter by which outgoing radiation was carried out from the ultrashort pulse laser 20 is condensed on a target 14 using the focal lens 22, and ablation of the target 14 is carried out.

[0103] By opening and closing a shutter, ablation of the target 14 is carried out to the shape of a spot without omission and duplication, moving the focal lens 22.

[0104] And the mass of the ion of monovalence generated by the exposure of the ultrashort pulse laser light to a target 14 is measured with the quadrupole mass spectrograph 16.

[0105] An example of the mass spectrum of the sample measured by the quadrupole mass spectrograph 16 is shown in drawing 8 by the above-mentioned technique.

[0106] In addition, the analytical method of the macromolecule using the laser ablation by this invention can be used for the mass analysis of various kinds of macromolecules, such as DNA, protein, RNA and PNA, a lipid, and sugar.

[0107] Moreover, of course about the macromolecule of these various kinds, what attached the element indicator is analyzable.

[0108] That is, by carrying out ablation of the giant molecules, such as protein which carried out the indicator with an unit or two or more isotopes with ultrashort pulse laser, albumin, and DNA, atom ionization of the giant-molecule configuration element can be carried out completely, and quantum measurement of a giant molecule can be performed by carrying out mass analysis of the ionized labelled atom. Thereby, the isotope of varieties can be used now as an indicator. Therefore, the object range of the macromolecule which can carry out mass analysis can be extended now by leaps and bounds.

[0109] That is, giant-molecule sample itself which carried out the indicator with the isotope is ionized on atomic level by this invention, and since it becomes possible to detect a labelled atom, the object range in which mass analysis is possible can be extended by leaps and bounds. For example, it becomes possible to use an isotope as an indicator of DNA, and the class of indicator can be increased also to 270 which is the number of stable isotopes. This can increase amount of information by leaps and bounds as compared with the fluorescence method (two kinds) and radioisotope (about ten kinds) which are the conventional indicator method.

[0110] In addition, in the above-mentioned gestalt of operation, although the quadrupole mass spectrograph was used as a mass spectrograph, of course, it is not what is restricted to this, and when the time-of-flight mass spectrograph which performs mass analysis by measuring atomic time of flight is used, mass analysis of two or more atoms by one laser radiation can be performed to coincidence. Moreover, also when the amount analyzer of ion cyclotron mold fourier strange obversions is used as a mass spectrograph, it becomes possible to perform mass analysis of two or more atoms to coincidence.

[0111] Moreover, although mass analysis was explained as analytical method of a macromolecule, of course, it is not what is restricted to this, and you may make it use this invention about the analysis of those other than mass analysis in the above-mentioned gestalt of operation.

[0112] Moreover, although the rotation installation terminal 18 which moves a target 14 and which rotates a target 14 as a migration means was used, of course, it is not what is restricted to this, and you may make it use proper migration means by which a target 14 can be laid, such as a movable table, in the above-mentioned gestalt of operation.

[0113] Moreover, although it was made to carry out ablation of the target 14 by rotating a target 14 using the rotation installation terminal 18 without omission and duplication, in the above-mentioned gestalt of operation, it may be made not to be what is restricted to this of course, and to carry out [ target / 14 ] ablation in a migration means to move the exposure location to the target of ultrashort pulse laser light, as it prepares without omission and duplication.

[0114]

[Effect of the Invention] Since it is constituted as explained above, this invention generates the atomic ion of the configuration atom which constitutes a macromolecule, are the analytical method of the macromolecule using the laser ablation which analyzed the generated atomic ion, and its system, and does so the outstanding effectiveness that the mass-analysis approach of the macromolecule using the laser ablation it was made not require the analysis apparatus of a high resolution, and its system can be offered. Here, more, in a detail, when performing mass analysis, while being able to eliminate a possibility that the analysis of a mass spectrum may become difficult, the outstanding effectiveness of not needing the mass spectroscopy of a high resolution is done so.

[0115] Moreover, since this invention is constituted as explained above, it does so the outstanding effectiveness that a system configuration can be compacted sharply.

[0116] Furthermore, since this invention is constituted as explained above, it does so the outstanding effectiveness that efficient analysis can be performed now, also in the situation which the indicator isotope of varieties mixed.

---

[Translation done.]



\* NOTICES \*

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the conceptual configuration explanatory view of an example of the example mass analysis structure of a system of the analysis system of the macromolecule for enforcing analytical method of the macromolecule using the laser ablation by this invention.

[Drawing 2] It is the graph showing the specification of two kinds of samples (a sample 1 and sample 2) used for the experiment.

[Drawing 3] (a), (b), and (c) are the mass spectra of the sample 1 measured by the quadrupole mass spectrograph. The case where (a) sets the output of short pulse laser light to 230microJ is shown, the case where (b) sets the output of short pulse laser light to 53microJ is shown, and (c) shows the case where the output of short pulse laser light is set to 480microJ. In addition, about measurement of (c), rather than the case of measurement of (a) and (b), the double figures sensibility of a quadrupole mass spectrograph was lowered, and was measured.

[Drawing 4] It is the microphotography in which the condition of a target that the sample 1 was stripped off by the exposure of ultrashort pulse laser light is shown.

[Drawing 5] It is the explanatory view showing the result of having measured the depth and area of the blemish formed in the target.

[Drawing 6] It is the mass spectrum of the sample 2 measured by the quadrupole mass spectrograph.

[Drawing 7] It is the mass spectrum of the sample 3 measured by the quadrupole mass spectrograph.

[Drawing 8] It is the mass spectrum of the sample 4 measured by the quadrupole mass spectrograph.

[Description of Notations]

10 Mass Analysis System

12 Vacuum Tub

14 Target

16 Quadrupole Mass Spectrograph

18 Rotation Installation Terminal

20 Ultrashort Pulse Laser

22 Focal Lens

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

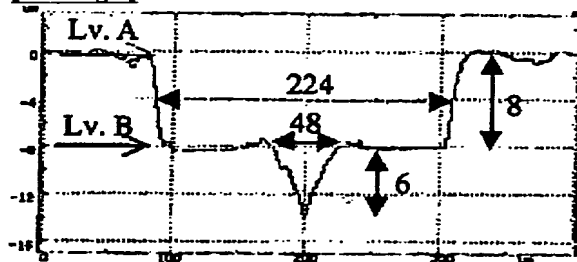
## DRAWINGS

[Drawing 2]

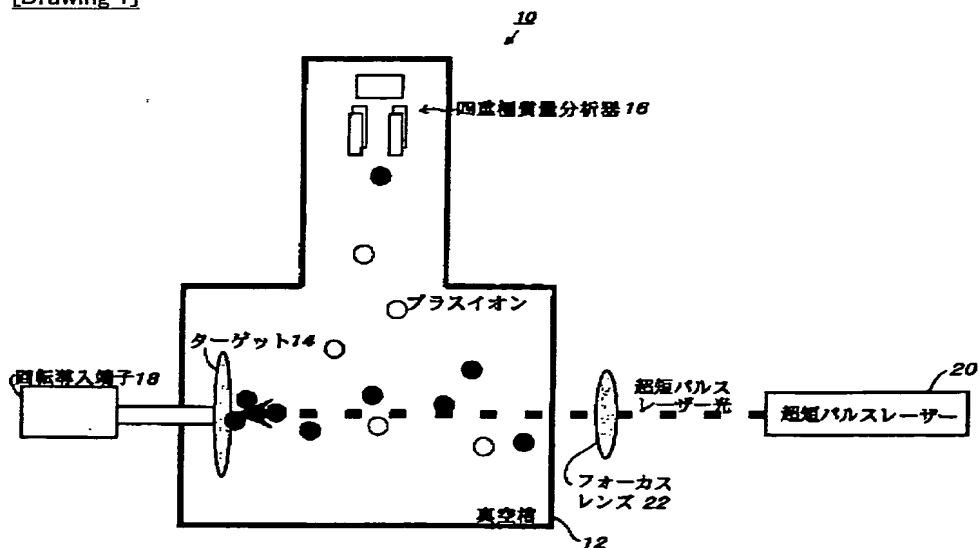
	サンプル 1	サンプル 2 (dATP)
化学式	$C_{60}H_{12}BuP_2O_6$	$C_{10}H_{12}N_3O_{12}P_3Na_4$
分子量	1193	579
溶媒	エタノール	水
濃度	0.7 mMol/l	100 mMol/l
塗布量	0.0064 (g) (乾燥後)	100 (μl) (乾燥前)
耐熱温度	150 °C	-20 °C 半年 4 °C 0.5 % / month 20 °C 5 % / month 37 °C 1 % / day
分子数 / スポット	$\sim 2 \times 10^{14}$	
その他	溶質 : 5.5931 (g) 溶媒 : 5.6090 (g) で混合	

2種類のサンプルの仕様

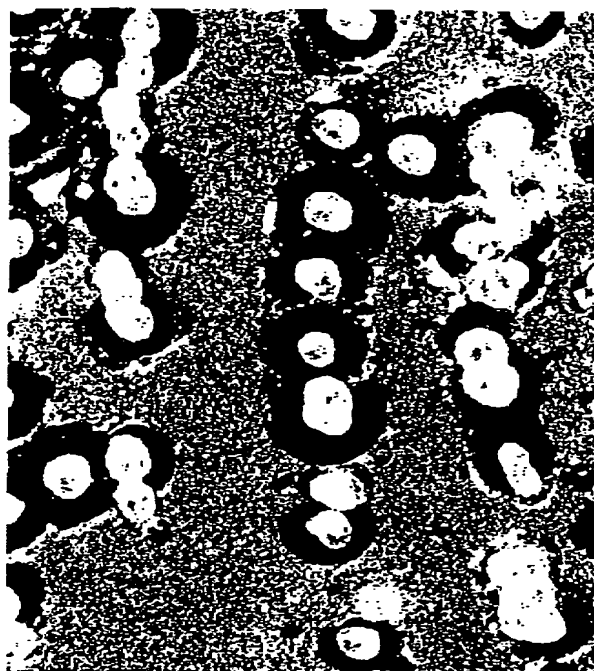
[Drawing 5]



[Drawing 1]

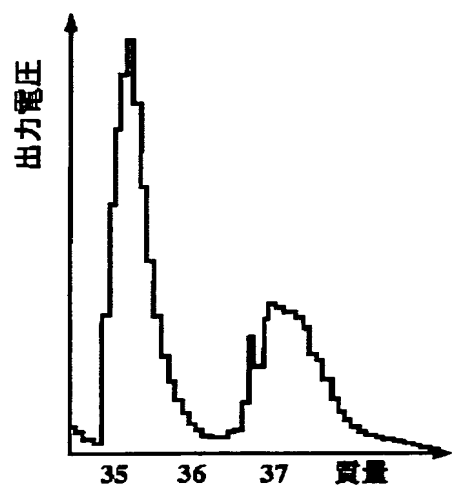


[Drawing 4]



[Drawing 8]

## 質量スペクトラム



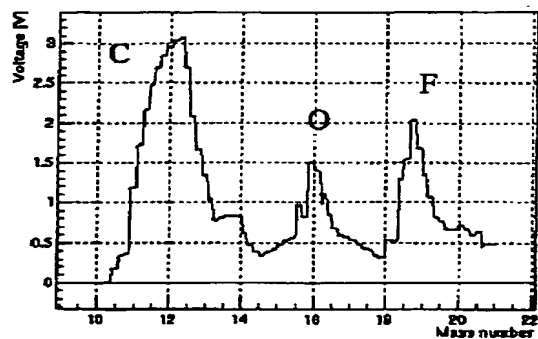
サンプル 4 : 5-Chloro-2'-Deoxyuridine

化学式 :  $C_9H_{11}ClN_2O_5$ 

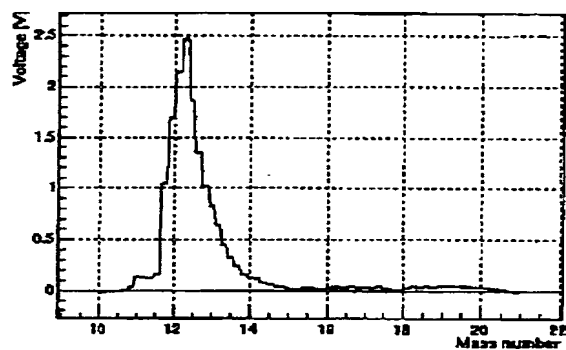
[Drawing 3]

BEST AVAILABLE COPY

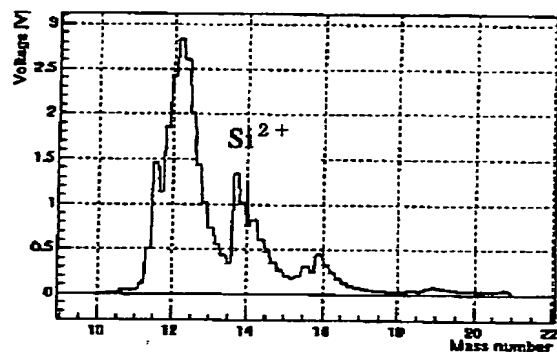
(a)



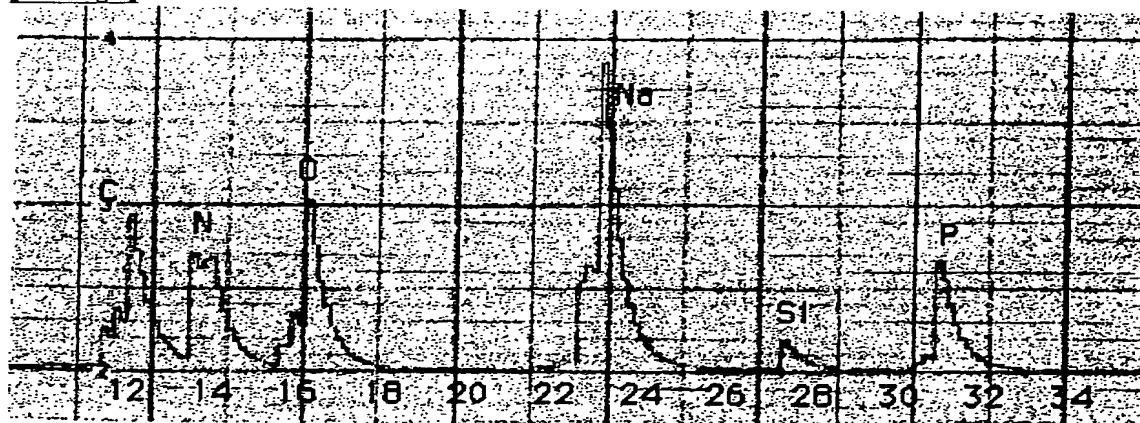
(b)



(c)



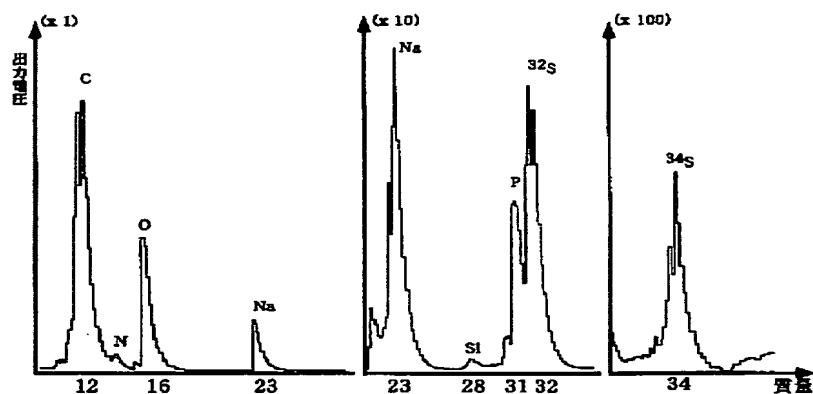
[Drawing 6]



BEST AVAILABLE COPY

[Drawing 7]

## 質量スペクトラム



サンプル 3 : 2'-Deoxyadenosine 5'-O-(1-Thiotriphosphate)

化学式:  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}_3\text{SNa}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 

レーザー尖頭値出力: 2 GW

[Translation done.]

BEST AVAILABLE COPY